

08.09.00

REC'D 17 OCT 2000

WIPO PCT

ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

4

potvrzuje, že

**BIOPHARM VÝZKUMNÝ ÚSTAV BIOFARMACIE A VETERINÁRNÍCH LÉČIV, A.S.,**  
**Jílové u Prahy, CZ**

podal(i) dne 08.09.1999

přihlášku vynálezu značky spisu **PV 1999 - 3186**

a že připojený popis a 12 výkresů se shoduje úplně  
s původně podanými přílohami této přihlášky.

Za předsedu: Ing. Hošková Marta

*Hošková*



V Praze dne 11.10.2000



**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

## Oblast techniky

Zpùsob konstrukce transgenní drùbež

Biotecnologický výzkum v oblasti transgenní drùbež nej zdaleka tak úspěšný jako tomu je u savců. Hlavní příčinou tohoto stavu je unikátní rozmožovací

Příčinou je u savců, že vysokým výkonom vede k vysokému růstu a vysokému tlaku. Hlavní příčinou tohoto stavu je unikátní rozmožovací

Výhález se tyká zpùsobu konstrukce transgenní drùbež výzkum

prapohlavních spermatozoidů bunek pro přenos genetické informace u

drùbež.

Dosavadní stav techniky

Příčinou je u savců, že vysokým výkonom vede k vysokému růstu a vysokému tlaku. Hlavní příčinou tohoto stavu je unikátní rozmožovací

založené na vysokém tlaku. Hlavní příčinou tohoto stavu je unikátní rozmožovací

založené na vysokém tlaku. Hlavní příčinou tohoto stavu je unikátní rozmožovací

založené na vysokém tlaku. Hlavní příčinou tohoto stavu je unikátní rozmožovací

založené na vysokém tlaku. Hlavní příčinou tohoto stavu je unikátní rozmožovací

založené na vysokém tlaku. Hlavní příčinou tohoto stavu je unikátní rozmožovací

založené na vysokém tlaku. Hlavní příčinou tohoto stavu je unikátní rozmožovací

založené na vysokém tlaku. Hlavní příčinou tohoto stavu je unikátní rozmožovací

založené na vysokém tlaku. Hlavní příčinou tohoto stavu je unikátní rozmožovací

založené na vysokém tlaku. Hlavní příčinou tohoto stavu je unikátní rozmožovací

Pouze fakt, že uvedený způsob přenosu prapohlavních spermatogoniálních buněk z jednoho jedince do druhého je funkční, je nesmírně cenný a kromě této vlastní skutečnosti nesmírně zajímavý právě při tvorbě transgenní drůbeže. Prapohlavní, spermatogoniální buňky lze snadno před vlastní implantací do kohouta akceptora in vitro transfekovat cizorodou genetickou informací, která bude dál z 1/2 přenášena na potomstvo v F1 generaci. Takto pravděpodobně bude otevřena reálná cesta pro využití drůbeže (drůbežího vejcovodu) jako bioreaktoru pro produkci specifických např. pro farmaceutický průmysl cenných proteinů.

Původci vynálezu bylo provedeno velké množství pokusů na ověření způsobu podle vynálezu, z nichž některé byly vybrány do následující příkladové části, která je dále podložena přílohou grafů, stránkou obrázků.

### Příklady provedení

#### Příklad 1

##### *– úplná sterilizace kohouta akceptora*

Dospělý kohout inbrední linie plemene Leghornka bílá (bílá barva peří způsobena dominantní alelou I I v lokusu I) produkovující ejakulát byl fixován v boxu tak, aby bylo možné zevně z boční strany těla provést ozáření přesně na plochu velikosti varlat pomocí gama paprsků. Jako vhodný se ukázal přístroj Theratron T1000 a isotop <sup>60</sup> Co. Varlata kohouta byla pomocí ozařovacího přístroje 5x za sebou v týdenním intervalu ozářena minimálně dávkou 8 Gy. Aniž by se ozáření jakkoliv projevilo na zdravotním stavu a chovné kondici kohouta zhruba po 90 dnech po posledním ozáření ztratí kohout trvale schopnost produkce spermíí a je připraven po uvedené době ke kolonizaci varlat prapohlavními spermatogoniálními buňkami kohouta donora, viz graf č. 1 a graf č. 2. a obrázek č. 1 v příloze.

##### *– příprava a aplikace prapohlavních, spermatogoniálních buněk kohouta donora*

Dospělému kohoutu inbrední linie plemene Minorka černá (černá barva peří způsobena recesivní alelou ii) produkovujícím ejakulát byl pomocí biopsie odebrán vzorek tkáně z varlat obsahující jeho prapohlavní spermatogoniální buňky. Tyto buňky byly umístěny po dobu 4 hodin do média M 199 Sigma (obsahující 10 % hmotn. Fetal bovine serum, 2 % hmotn. chicken serum, 1 % hmotn. pyruvate sodium, 1 % hmotn. gentamycin) při poměru ředění 1 : 1 s uvedeným médiem. Inkubace buněk probíhala při standardních podmínkách: při 5 % hmotn. obsahu oxidu uličitého a při teplotě 40 °C. Poté byly prapohlavní spermatogoniální buňky v celkovém objemu suspenze 200 mikrolitrů aplikovány pomocí injekční sříkačky do každého ozářeného varlate kohouta

Druhým nezbytným krokem úspěšného využití popsáного postupu je nutné zvládnutí přenosu spermatogoniálních prapohlavních buněk akceptora, tedy těch spermatogoniálních buněk, které umožní po přenosu funkční zabudování a rekolonizaci varlat akceptora a následnou produkci oplození schopných spermíí. To zatím přináší řadu potíží a nejednoznačných výsledků.

### Podstata vynálezu:

Výše uvedené nedostatky odstraňuje způsob konstrukce transgenní drůbeže, jejména přenosem prapohlavních spermatogoniálních buněk podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se pouze varlata kohouta akceptora opakovaně ozáří gamma paprsky, načež se do jeho neporušených sterilních varlat v intervalu 60 dní až dvou let od posledního ozáření implantují cizí prapohlavní spermatogoniální buňky kohouta donora, z nichž se dále produkují oplození schopné spermie s celou genetickou informací od kohouta donora. Po inseminaci slepic těmito nově vzniklými spermiami se vylíhne transgenní drůbež s 1/2 genetické informace od donora.

Způsob podle vynálezu se dále provádí tak, že se varlata kohouta akceptora 3x až 9x ozáří gamma paprsky o síle alespoň 8 Gy vždy v intervalu 3 až 9 dnů.

Výhodně se způsob podle vynálezu provádí tak, že se varlata kohouta akceptora 5x ozáří gamma paprsky o síle 8 Gy, vždy v týdenním intervalu.

Při tomto ozáření dojde na rozdíl od jiných současných technik k úplnému zlikvidování původních prapohlavních spermatogoniálních buněk ve varlatech akceptora, který již pak nadále nemůže produkovat spermie, přičemž struktura varlat včetně Sertoliho buněk zůstane zachována pro následnou implantaci cizích prapohlavních spermatogoniálních buněk kohouta donora. V těchto nově implantovaných prapohlavních spermatogoniálních buňkách jsou dále produkovány spermie, které jsou oplození schopné a nesou genetickou informaci prapohlavních spermatogoniálních buněk kohouta donora, viz schéma č. 1 v příloze.

Příprava transgenní drůbeže způsobem podle vynálezu je snadná a se stoprocentním výsledkem, protože spermatogoniální buňky kohouta donora mohou být transfekovány potřebnou žádanou genetickou informací a tak po jejich úspěšné implantaci do varlat kohouta akceptora dojde takto k tvorbě transgenního kohouta, který po inseminaci, či při přirozené plemenitbě bude z 1/2 předávat genetickou informaci na svoje potomstvo.

akceptora, v době ozáření kohout ztratí po ozáření jakoukoliv produkci ejakulátu, tedy 85 až 100 dní od posledního ozáření.

– *funkční produkce ejakulátu po přenesení prapohlavních spermatogoniálních buněk kohouta donora*

Ozářený kohout inbrední linie plemene Leghornka bílá - akceptor s neexistujícími funkčními varlaty po provedeném ozáření začal do 2 měsíců po provedené aplikaci cizích prapohlavních spermatogoniálních buněk kohouta inbrední linie plemene Minorka černá opět produkovat ejakulát s životaschopnými spermiami.

– *biologická testace přenesených prapohlavních spermatogoniálních buněk kohouta donora*

Po provedené inseminaci slepice inbrední linie plemena Leghornka žíhaná (šedivá žíhaná barva způsobená recessivní alelou ii genem žíhanosti vázaným na pohlaví B/-) ejakulátem odebraným od ozářeného kohouta inbrední linie plemene Leghornka bílá - akceptora cizích prapohlavních spermatogoniálních buněk kohouta inbrední linie plemene Minorka černá byla inseminovaná vejce dána do inkubátoru a po 21 dnech inkubace se vylíhla pouze černá kuřata.

Tato černá kuřata jsou jasným důkazem, že implantace a kolonizace prapohlavních, spermatogoniálních buňek kohouta donora byla úspěšná, protože vylíhnou-li se pouze černá nebo žíhaná kuřata, to ve své podstatě znamená nepřítomnost dominantní alely II, ale pouze přítomnost recessivní alely ii, tedy pouze přítomnost funkčních spermí kohouta s recessivním založením. Barvy peří ii, tedy v tomto případě s černou barvou peří, viz schéma č. 1 v příloze.

## Příklad 2

### *-neúplná sterilizace kohouta akceptora*

Dospělý kohout inbrední linie plemene Leghornka bílá (bílá barva peří způsobena dominantní alelou I I v lokusu I) produkování ejakulát byl fixován po ozáření stejně jako v příkladu 1. Varlata kohouta byla pomocí ozařovacího přístroje ozářena jednorázovou dávkou 18 Gy. Kohout, aniž by se ozáření jakkoliv projevilo na jeho zdravotním stavu a chovné kondici, neztratil ani po 200 dnech sledování trvale schopnost produkce spermí (oproti kontrole, graf č. 9 a č. 10), naopak po 150 dnech se koncentrace (viz. graf č. 3) a motilita (graf č. 4) vrátila do původních hodnot před ozářením a kohout nebyl připraven ke kolonizaci varlat prapohlavními, spermatogoniálními buňkami kohouta donora.



### Příklad 3

#### *-neúplná sterilizace kohouta akceptora*

Dospělý kohout inbrední linie plemene Leghornka bílá (bílá barva peří způsobena dominantní alelou I I v lokusu I) produkující ejakulát byl fixován při ozáření stejně jako v příkladu 1. Varlata kohouta byla pomocí ozařovacího přístroje ozářena jednorázovou dávkou 22 Gy. Kohout, aniž by se ozáření jakkoliv projevilo na jeho zdravotním stavu a chovné kondici, neztratil ani po 200 dnech sledování trvale schopnost produkce spermíí, naopak po 160 dnech se koncentrace (viz. graf č.5) a motilita (graf č.6) sice o něco nižší vrátila do původních hodnot před ozářením a kohout nebyl připraven ke kolonizaci varlat prapohlavními, spermatogoniálními buňkami kohouta donora.

### Příklad 4

#### *-neúplná sterilizace kohouta akceptora*

Dospělý kohout inbrední linie plemene Leghornka bílá (bílá barva peří způsobena dominantní alelou I I v lokusu I) produkující ejakulát byl fixován pro ozáření stejně jako v příkladu 1. Varlata kohouta byla pomocí ozařovacího přístroje ozářena jednorázovou dávkou 26 Gy. Tato dávka se projevila negativně na zdravotním stavu kohouta, místo ozáření bylo na kůži lehce zduřelé a načervenalé kohout jevil známky únavy ještě několik dnů po ozáření. Kohout ztratil téměř po 160 dnech schopnost produkce spermíí, viz graf č.7, ale produkce ejakulátu v nepatrné míře pokračovala a spermie vykazovaly i určitou motilitu, viz graf č.8. Bylo možné konstatovat, že tato dávka byla poměrně vysoká, zatížila zdravotní stav kohouta, ale nebyla z pohledu ještě okračující produkce ejakulátu dostatečná a kohout nebyl připraven ke kolonizaci varlat prapohlavními spermatogoniálními buňkami kohouta donora.

### Průmyslová využitelnost

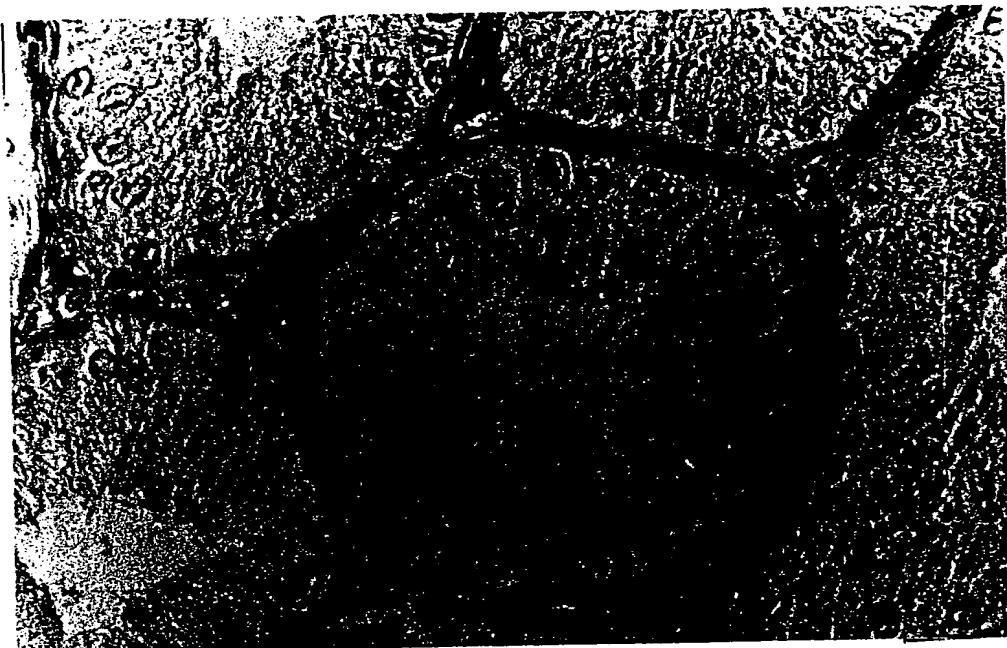
Opakováním ozářením gamma paprsky varlat kohouta akceptora a implantací cizích prapohlavních spermatogoniálních buněk kohouta donora do neporušených sterilních varlat kohouta akceptora dojde u něj k opětovné produkci oplození schopných spermíí s celou genetickou informací od kohouta donora. Po inseminaci slepic těmito produkovanými spermiami vznikne transgenní drůbež s 1/2 genetické informace od donora. Uvedený postup bude využíván průmyslovým způsobem drůbežářskými šlechtitelskými a biotechnologickými společnostmi.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob konstrukce transgenní drůbeže, zejména přenosem prapohlavních spermatogoniálních buněk, vyznáčující se tím, že se pouze varlata kohouta akceptora zevně opakovaně ozáří gama paprsky, načež se do jeho neporušených sterilních varlat v intervalu 60 dní až 2 let od posledního ozáření implantují cizí prapohlavní spermatogoniální buňky kohouta donora, z nichž se dále produkují oplození schopné spermie s celou genetickou informací od kohouta donora, z kterých po inseminaci slepic vznikne transgenní drůbež s 1/2 genetické informace od donora.
2. Způsob podle nároku 1, vyznáčující se tím, že se varlata kohouta akceptora ozáří 3x až 9x gama paprsky o síle alespoň 8 Gy vždy v intervalu 3 až 9 dní.
3. Způsob podle nároku 1, vyznáčující se tím, že se varlata kohouta akceptora ozáří 5x gama paprsky o síle 8 Gy vždy v týdenních intervalech.

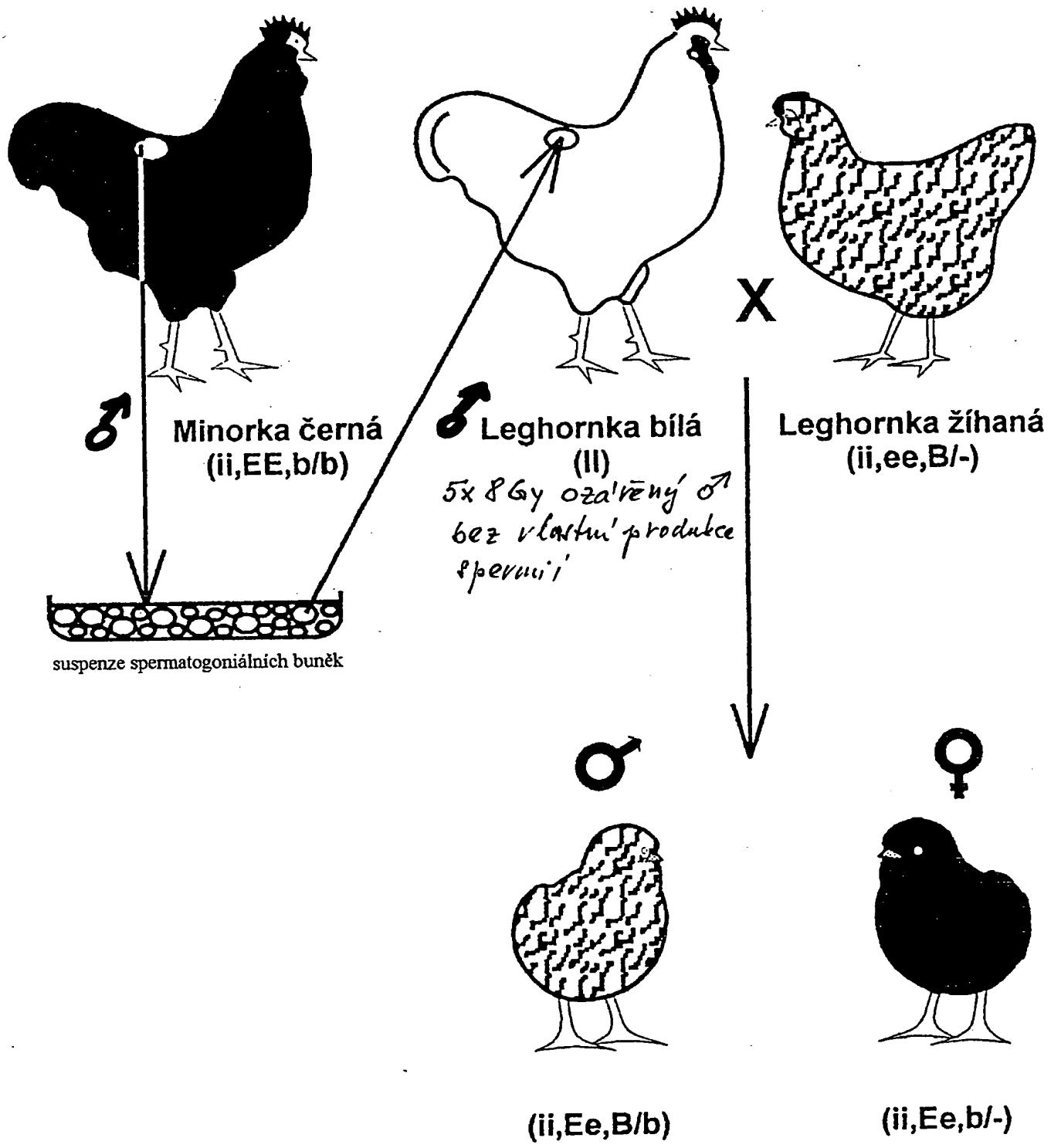
## PŘÍLOHY

fotografie semenotvorných kanálků po opakovaném (5x8 Gy) ozáření varlat kohouta akceptora. V semenotvorných kanálkách jsou patrné pouze Sertoliho buňky, prapohlavní, spermatogoniální buňky nejsou patrné. (barveno Pas, x 400)

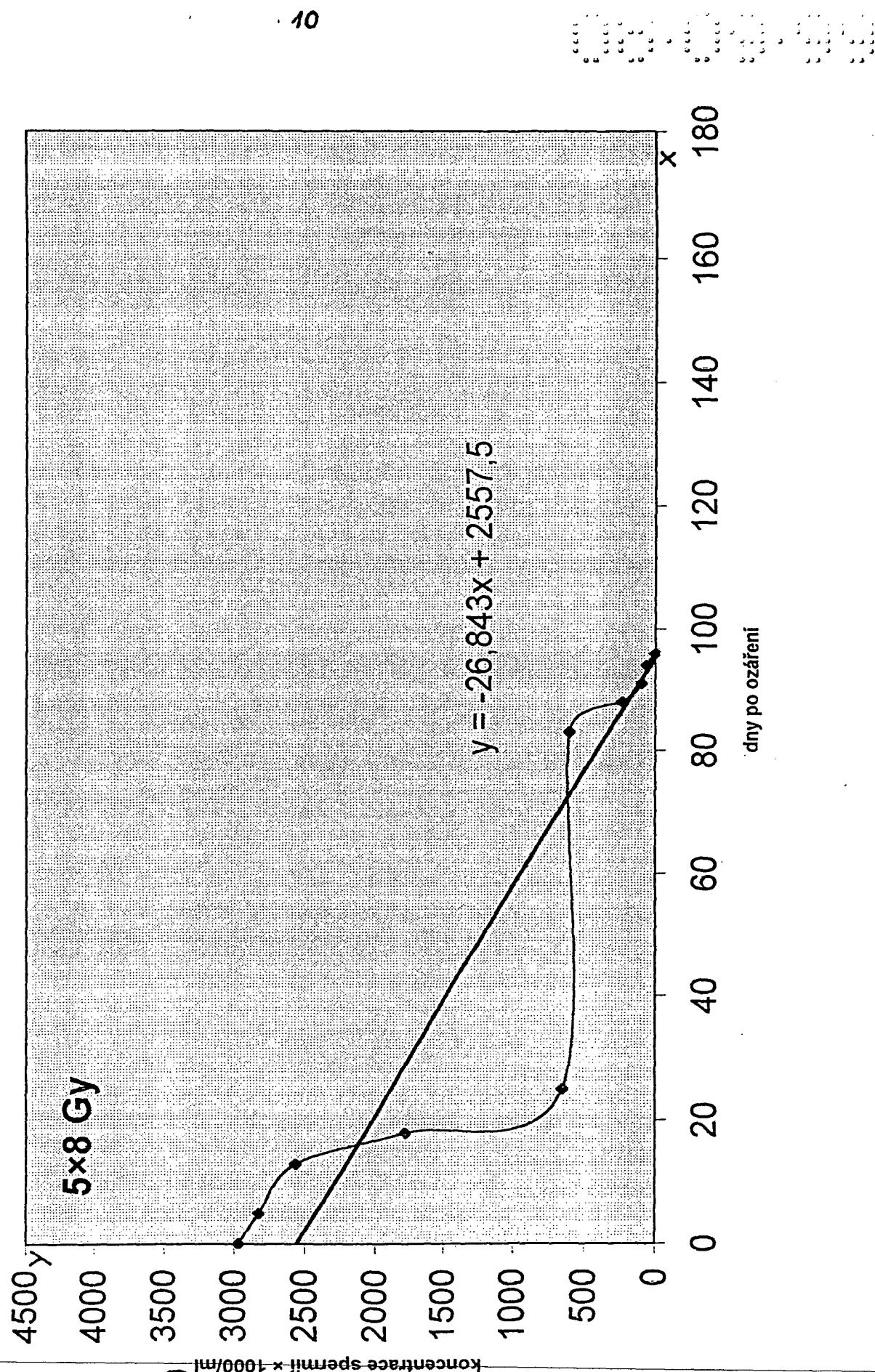


obr. č. 1

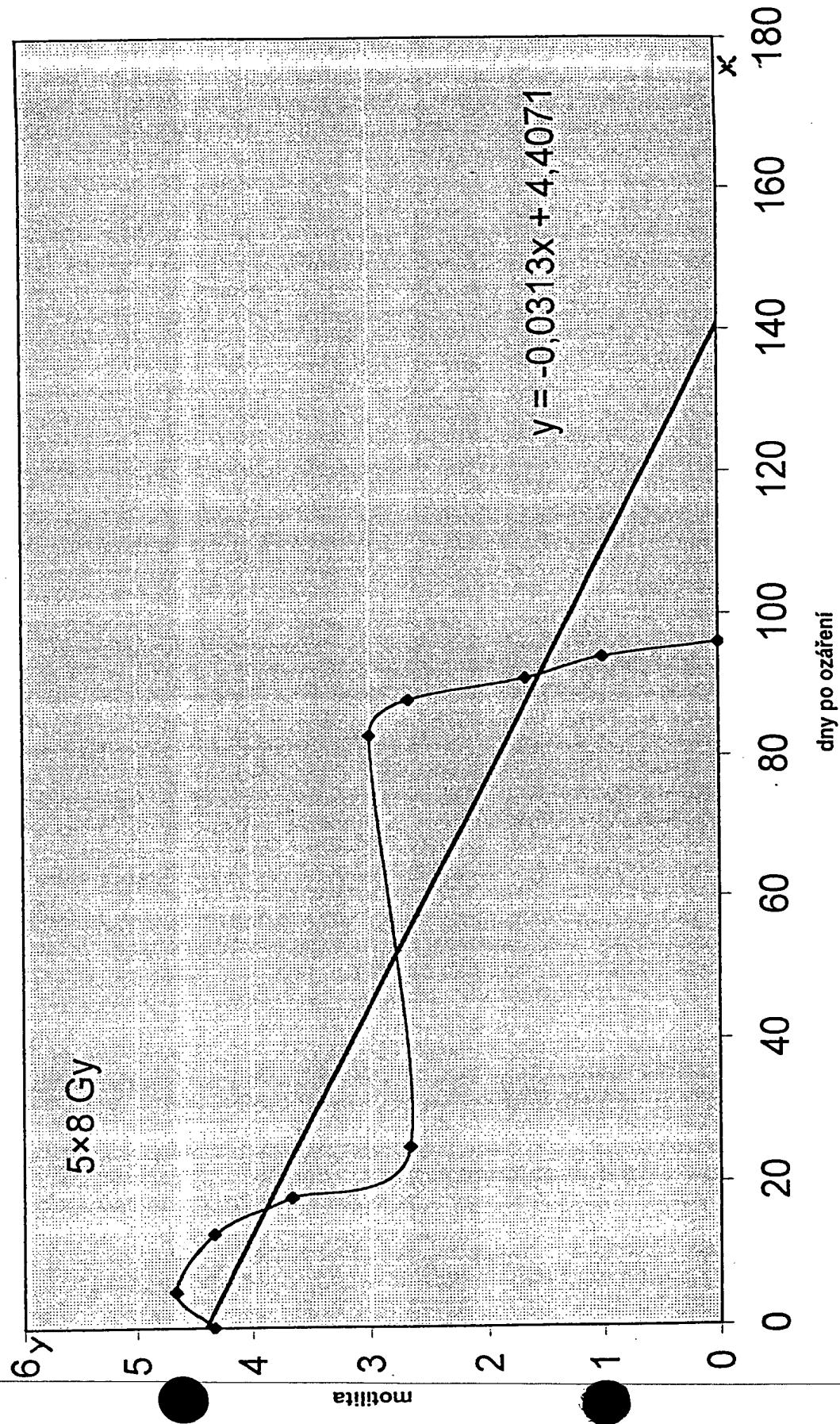
schéma č.1

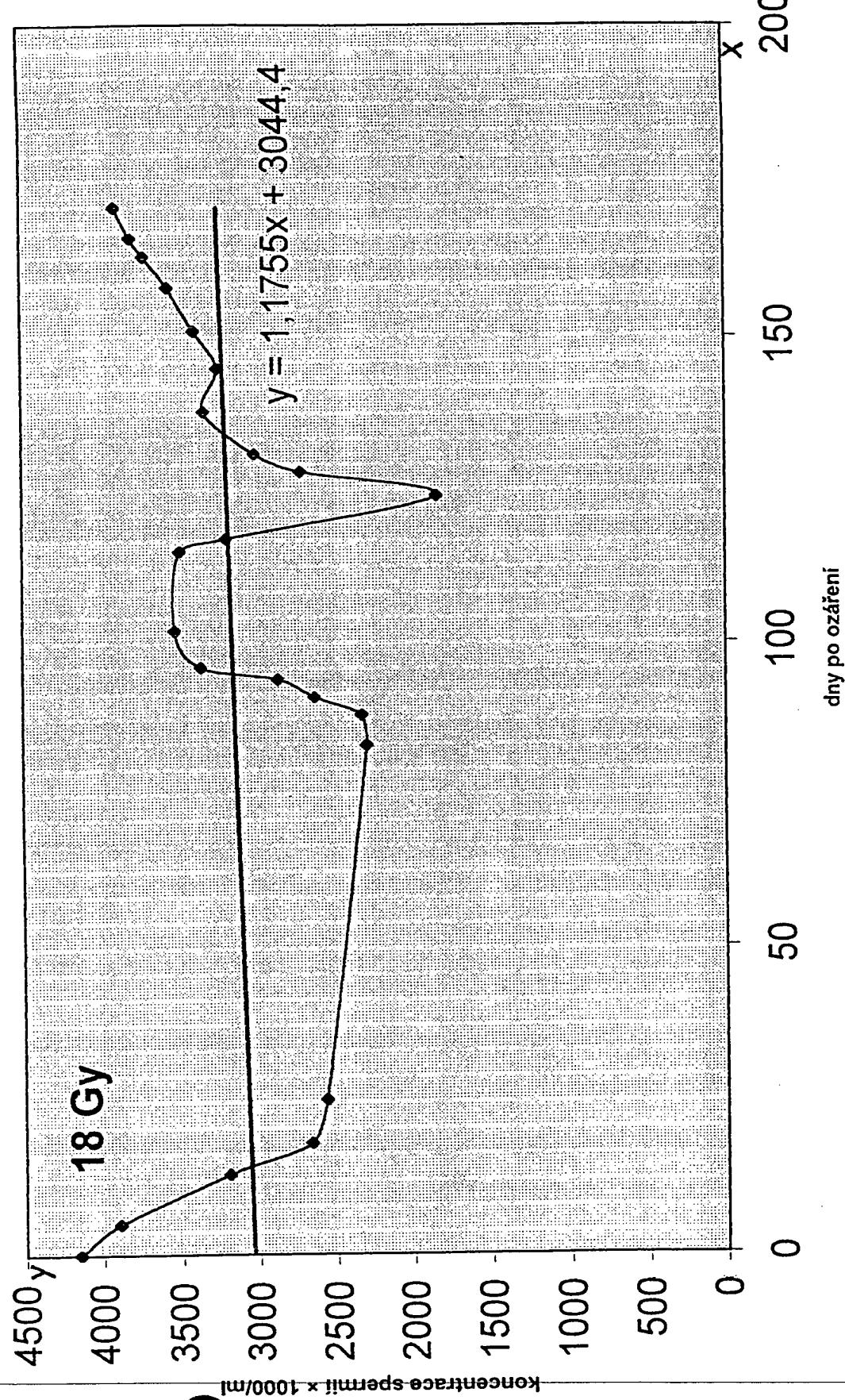


Graf č. 1

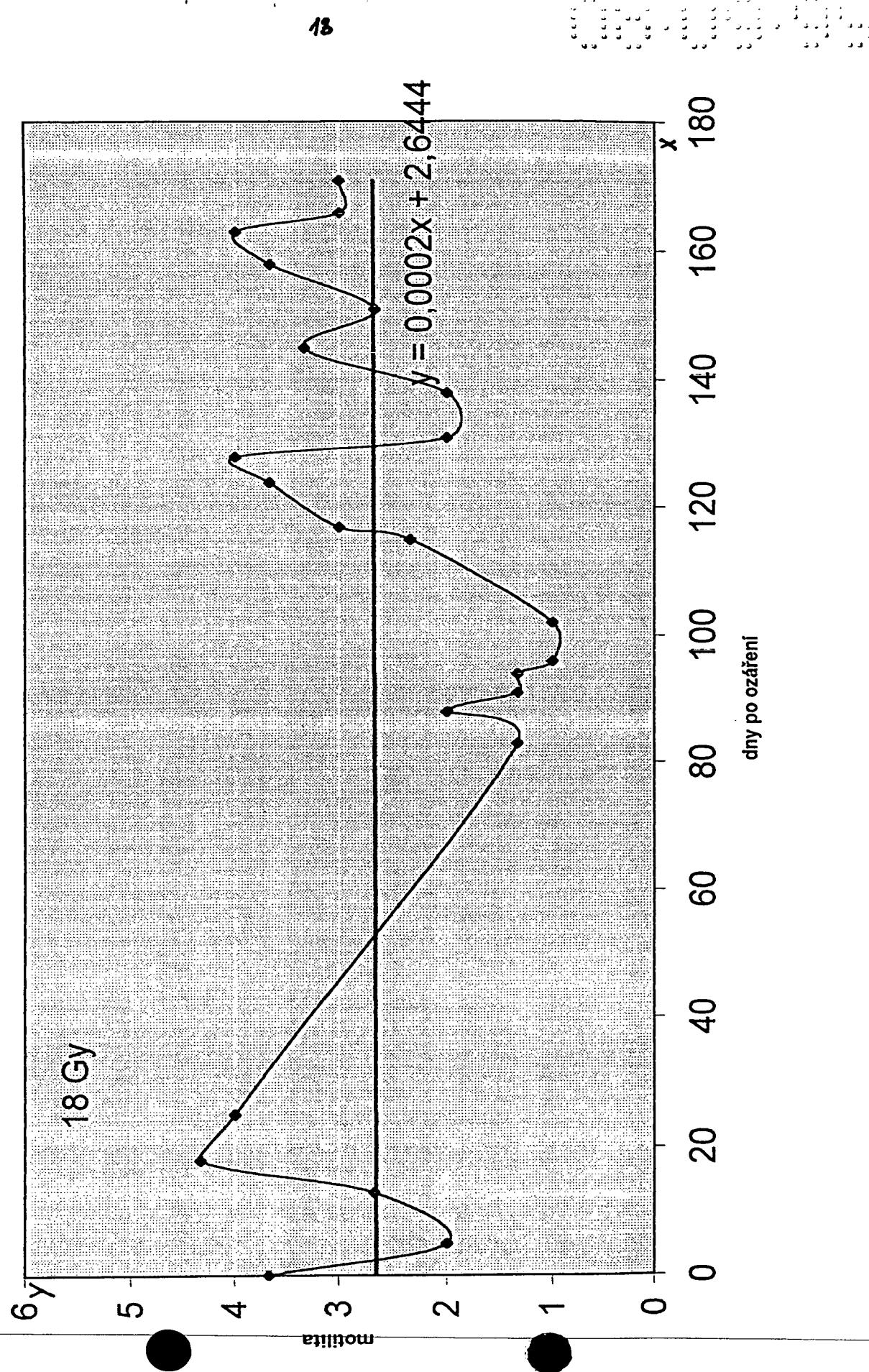


Graf č. 2

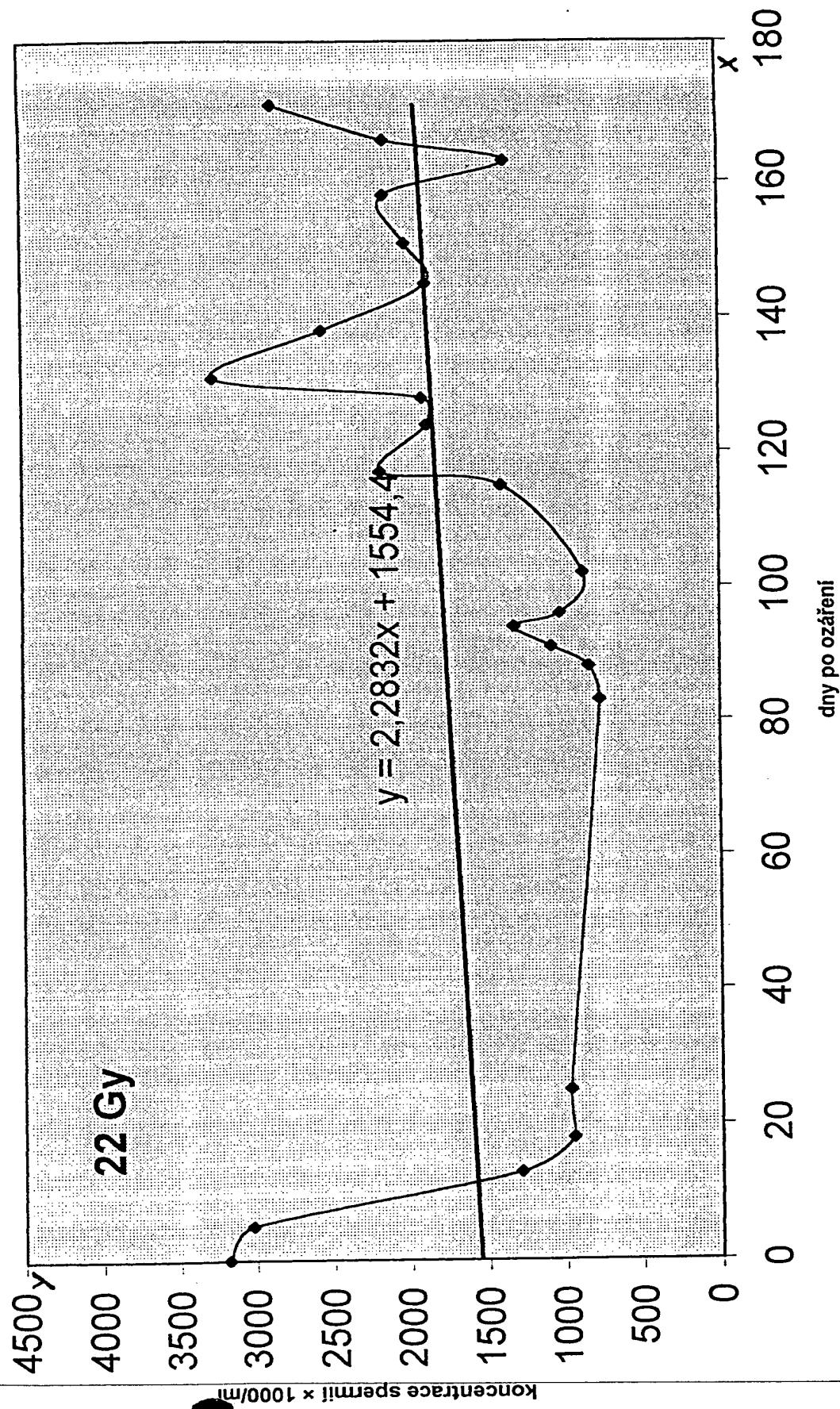




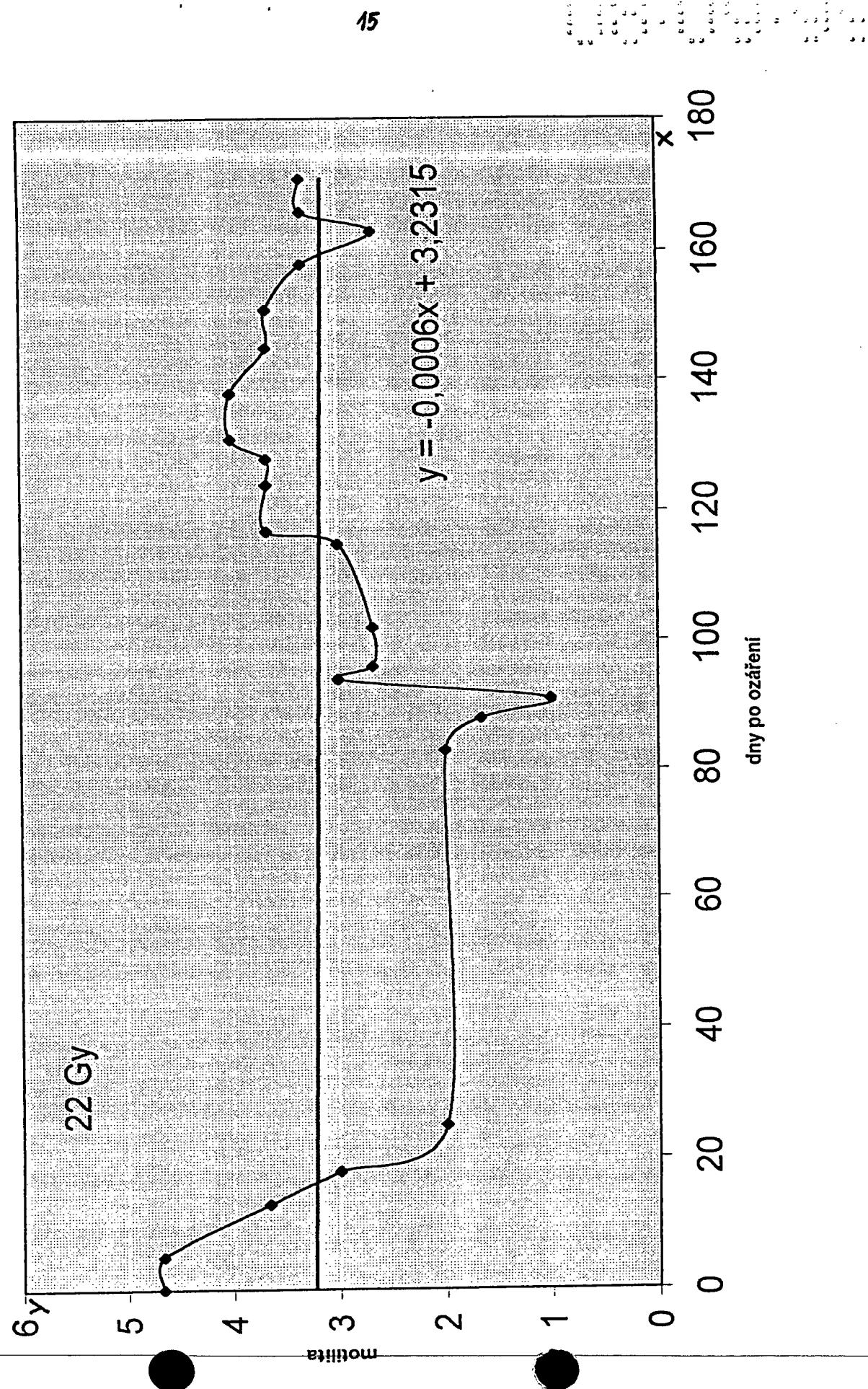
Graf č. 4



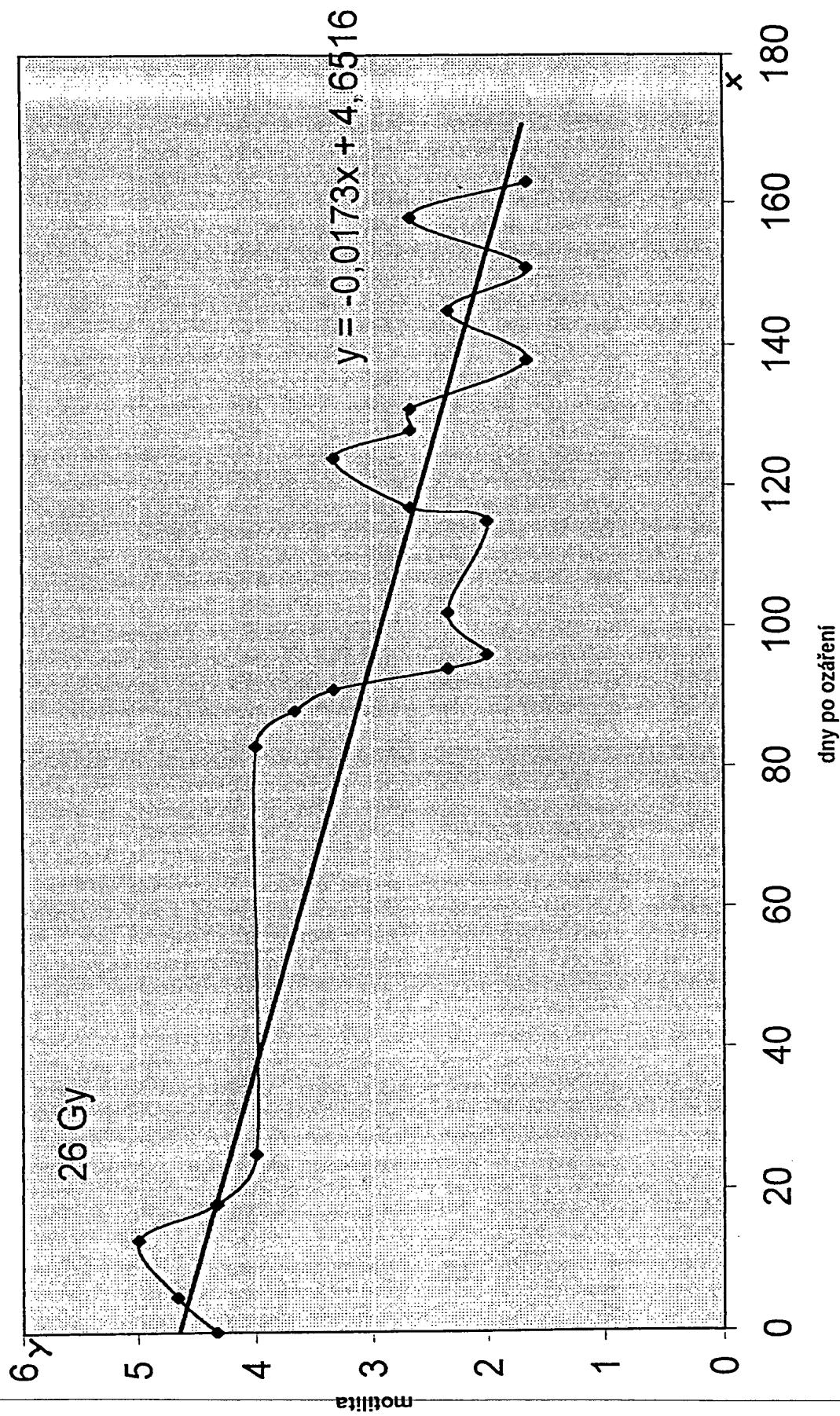
Graf č. 5



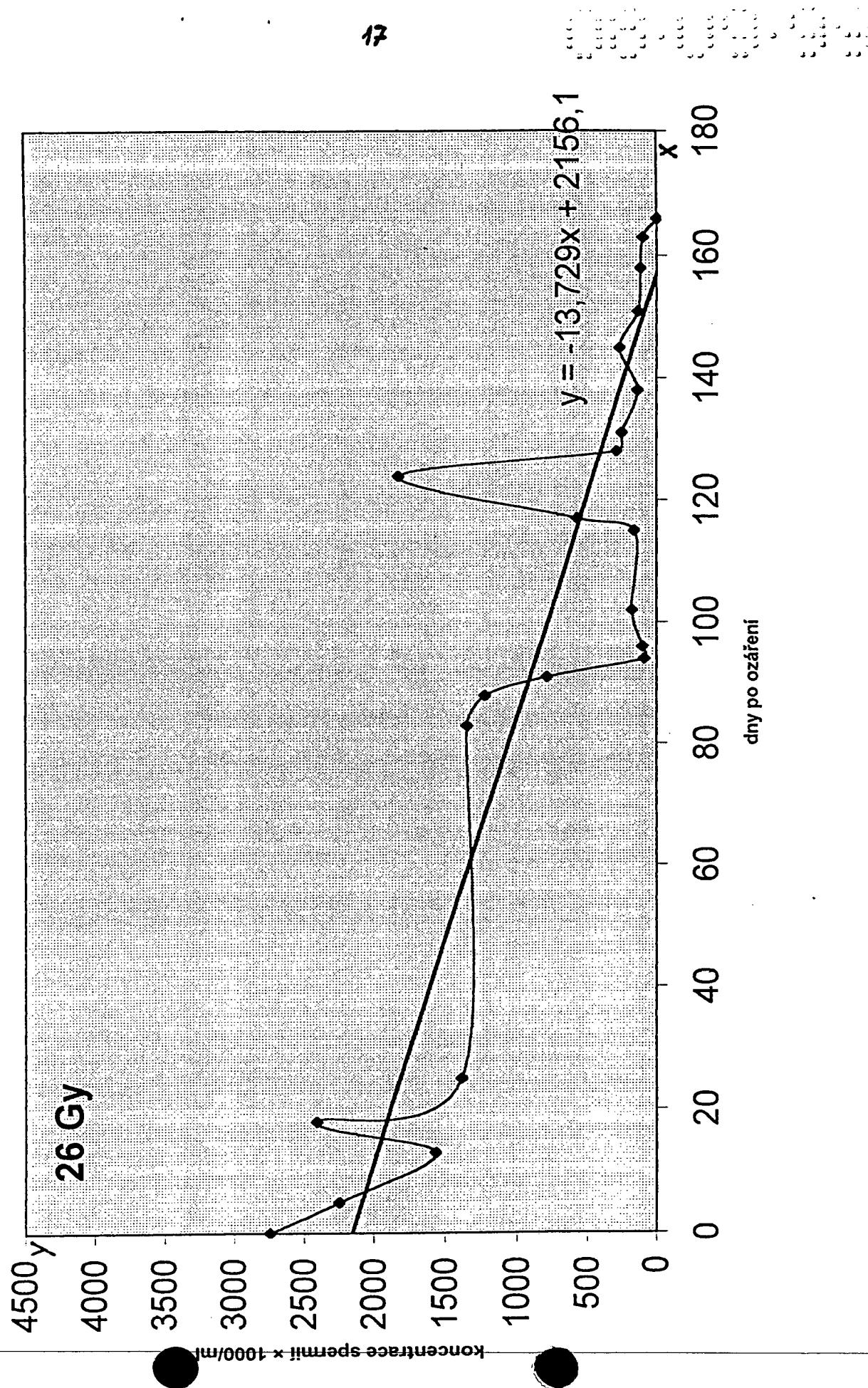
Graf č. 6



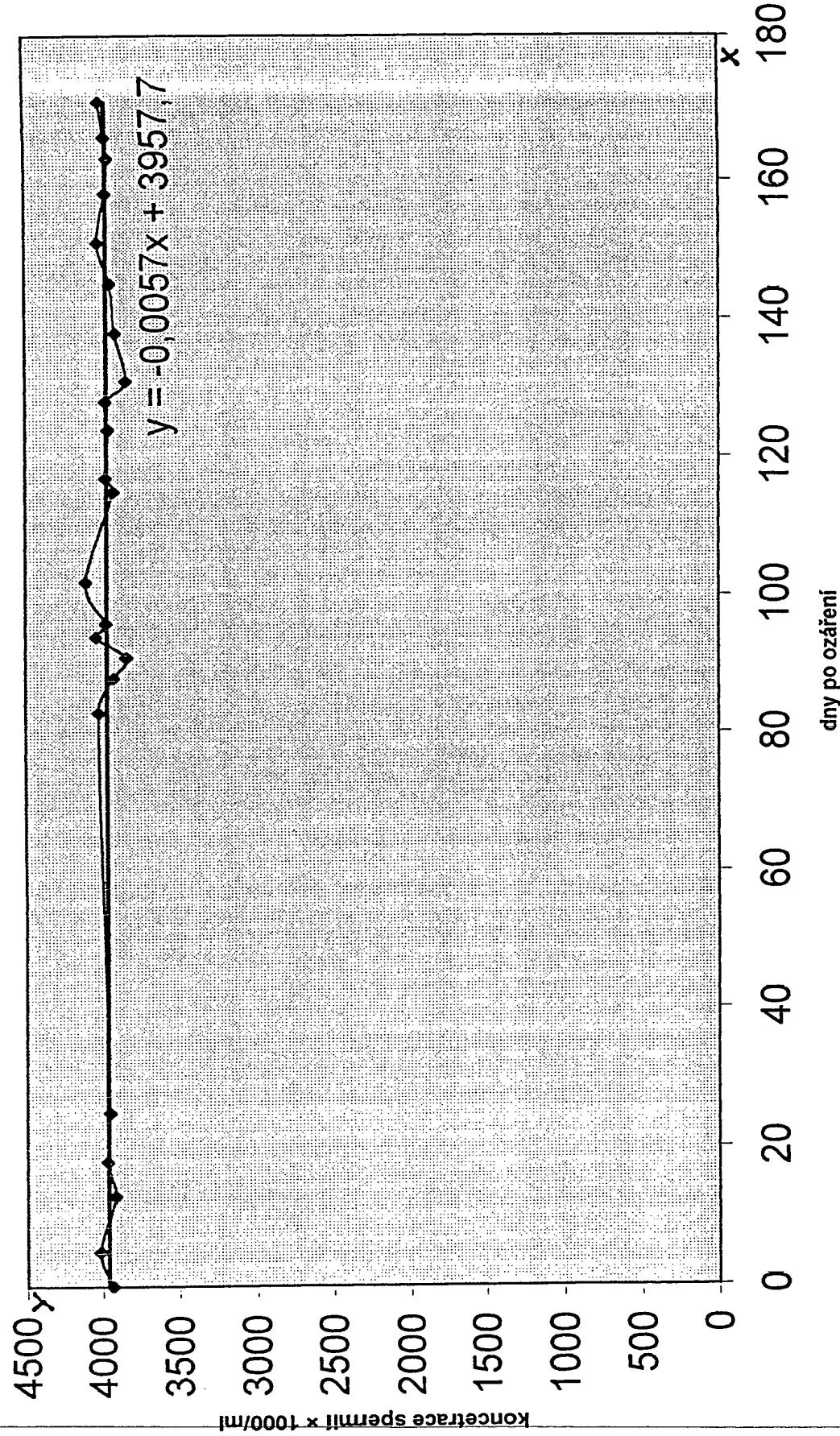
Graf č. 8



Graf č. 7



Graf č. 9 - kontrola



Graf č. 10 - kontrola

